

# Efecto de la periodontitis asociada a obesidad en el perfil bioquímico plasmático. Estudio en ratas Wistar.



Trabajo de Fin de Master <sup>L</sup><sub>SEP</sub>

Máster en Ciencias Odontológicas. <sup>L</sup><sub>SEP</sub> Facultad de Odontología.

Universidad Complutense de Madrid

**Alumno:** Giacomo Baima

**Tutor:** Dr. David Herrera

## ÍNDICE

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 1. ABSTRACT.....                  | 3  |
| 2. RESUMEN.....                   | 4  |
| 3. INTRODUCCIÓN.....              | 6  |
| 4. JUSTIFICACIÓN Y HIPÓTESIS..... | 12 |
| 5. OBJETIVOS.....                 | 12 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....      | 13 |
| 7. RESULTADOS.....                | 19 |
| 8. DISCUSIÓN.....                 | 26 |
| 9. CONCLUSIONES.....              | 36 |
| 10. REFERENCIAS.....              | 37 |

## Abstract

**Background:** In the last decade, several epidemiological studies have found an association between obesity and increased prevalence of periodontitis. Although, several issues regarding the temporal association and the molecular mechanisms involved still need to be addressed.

**Objective:** To evaluate the effects of a high fat diet on the clinical onset of periodontitis and the plasmatic determinants of inflammation and metabolism dysregulation.

**Methods:** 28 male Wistar rats were randomly divided into four different groups: 1. rats fed with control diet (CON); 2. rats fed with high fat diet (HFD); 3. rats fed with control diet and periodontitis (CON-Perio); 4. rats fed with high fat diet and periodontitis (HFD-Perio). Periodontitis was induced through oral gavages with *P. gingivalis* and *F. nucleatum*. A periodontal examination was performed and the plasmatic levels of cytokines, adipocytokines and lipids were estimated.

**Results:** A significant mean increase in body weight ( $p < 0.05$ ) was observed in animals fed with a hypercaloric diet compared to controls. Groups with induced periodontitis displayed statistically significant increases in PPD, BOP and MGI compared to control groups without periodontitis, with the HFD-Perio group exhibiting the highest values. Plasma levels of pro-inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and the concentration of free fatty acids and triglycerides revealed statistically significant increases ( $p < 0.05$ ) in the groups with periodontitis, compared to non-periodontitis groups. Plasma levels of leptin, visfatin and resistin showed an increasing trend in rats with periodontitis, while adiponectin levels were reduced.

**Conclusions:** It may be asserted that obesity induced through a high fatty diet increases the incidence and severity of periodontal breakdown in a Wistar rat model. In addition, the complex proinflammatory and dysmetabolic state brought about by obesity and periodontitis can bolster

the deleterious effects of the two diseases.

## Resumen

**Antecedentes:** En la última década, numerosos estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado una asociación entre la obesidad y una prevalencia aumentada de periodontitis. Sin embargo, muchos aspectos relacionados con las inferencias causales y con los mecanismos moleculares involucrados tienen que ser evaluados.

**Objetivos:** Analizar el desarrollo de periodontitis en relación a un consumo de dieta alta en grasa y las posibles modificaciones en parámetros pro-inflamatorios y metabólicos.

**Métodos:** Se utilizaron 28 ratas Wistar macho que fueron divididas en 4 grupos: 1. ratas con dieta control (CON); 2. ratas con dieta alta en grasa (HFD); 3. ratas con dieta control y periodontitis inducida (CON-Perio); 4. ratas con dieta alta en grasas y periodontitis inducida (HFD-Perio). La periodontitis se indujo a través de lavados orales con *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Se evaluaron índices clínicos periodontales y se analizaron los niveles circulantes de citoquinas, de adipocitoquinas y de lípidos.

**Resultados:** Los animales expuestos a una dieta hipercalórica presentaron un incremento de peso estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) respecto a los controles. Los grupos con periodontitis inducida mostraron un incremento de PPD, BOP y MGI estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) respecto a los grupos sin periodontitis, siendo los valores más elevados el grupo HFD-Perio. Las citoquinas pro-inflamatorias interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), y los niveles de ácidos grasos libres y de triglicéridos exhibieron niveles estadísticamente más elevados ( $p < 0,05$ ) en los grupos con periodontitis respecto a los grupos sin periodontitis. Las concentraciones plasmáticas de leptina, de

visfatina y resistina mostraron tendencia a aumentar en las ratas con periodontitis inducida, mientras que los niveles de adiponectina se redujeron en los grupos con periodontitis.

Conclusiones: Se puede afirmar que el estado dismetabólico e inflamatorio sistémico producido por el desarrollo de la obesidad es un factor que puede modificar la incidencia y la progresión de la periodontitis. Además, el tener periodontitis, también independientemente de la obesidad, se correlaciona a un desbalance en los niveles sistémicos de adipocitoquinas y de lípidos plasmáticos.

## Introducción

La periodontitis es una enfermedad de origen infeccioso que conduce a la destrucción de los tejidos periodontales como consecuencia de una desregulación de la homeostasis entre la microbiota subgingival y las defensas del hospedador (Armitage 2005; Sanz y van Winkelhoff 2011). Recientemente, la periodontitis severa ha sido considerada como la sexta patología más común a nivel global (Frencken y cols. 2017), con una prevalencia que se estima desde un 47% en adultos con más de 30 años, hasta un 85% en sujetos mayores de 65 años (Eke y cols. 2012; Chung y cols. 2011). Esta patología aparece como resultado de una infección polimicrobiana compleja en individuos susceptibles, aunque algunas especies bacterianas se consideran más implicadas que otras en su patogénesis (World Workshop in Periodontics 1996; Darveau 2010). En particular, tres especies bacterianas Gram negativas pertenecientes al complejo rojo descrito por Socransky, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, en conjunto con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, se han encontrado en proporciones más altas en los pacientes que padecen periodontitis (Socransky y cols. 1998) y se demostró que las mismas pueden inducir una enfermedad experimental reproducible y predecible en modelos animales (Lindhe y cols. 1973; Graves y cols. 2012).

Tal y como se ha mencionado, aunque el biofilm subgingival formado por estas bacterias sea el agente etiológico primario de la periodontitis, el desarrollo de modelos más complejos para explicar su patogénesis ha evidenciado que la presencia de una flora bacteriana periodontopatógena no es suficiente para producir la enfermedad: hay que tener en cuenta la interacción de múltiples factores, uno de los más importantes la susceptibilidad del individuo (Page y Kornman 1997; Hajishengallis 2014). Una posible hipótesis sería que ciertos antígenos o enzimas producidos por los patógenos de la placa dental activen la respuesta inflamatoria del huésped de una manera diferente en cada sujeto, la cual, si es incapaz de resolver el problema,

adquiere una naturaleza crónica y destructiva (Kornman y cols. 1997; Van Dyke 2009). De hecho, está claro que la regulación de la respuesta inflamatoria por la secreción de citoquinas a nivel local y sistémico juega un papel fundamental en modular la magnitud de la destrucción de los tejidos de soporte periodontales (Champagne y cols. 2003; Buduneli y Kinane 2011).

También es importante considerar que el desarrollo y la severidad de la periodontitis son influenciados por otros modificadores de riesgo ambientales, como el hábito del tabaquismo o la falta de higiene oral, y por otras patologías sistémicas como la diabetes, los trastornos inmunes o la obesidad (Borrell y Papapanou 2005; Lalla y Papapanou 2011; Zimmermann y cols. 2013).

La obesidad es una patología que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa en el cuerpo y se asocia a una inflamación sistémica crónica. Se define en los adultos por un índice de masa corporal (IMC) superior a los 30 kg/m<sup>2</sup>, mientras que un IMC entre los 25 y los 29,9 kg/m<sup>2</sup> indica un individuo con sobrepeso (Kopelman 2000). El IMC se calcula dividiendo los kilogramos de peso por el cuadrado de la estatura en metros. Es la medida más utilizada en los estudios epidemiológicos a pesar de que no diferencia entre masa grasa y masa muscular.

La causa de la obesidad reside en un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, debido a un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico y ricos en grasa y a un paralelo descenso en la actividad física. Al tratarse de una patología con etiología conductual, para la mayor parte de los individuos podría ser prevenible educando a la población para que adopte estilos de vida más saludables. Sin embargo, estudios en gemelos o de familias han evidenciado que la obesidad es altamente heredable, y que el riesgo individual de desarrollarla incrementa al tener parientes obesos (Yan y cols. 2007). De hecho, el desbalance calórico típico de la obesidad frecuentemente se desarrolla a partir de la combinación de factores genéticos y ambientales. El polimorfismo en varios genes que controlan el apetito, el metabolismo y la secreción de adipoquinas predisponen a la obesidad, pero se requiere la disponibilidad de

suficientes calorías y posiblemente otros factores para desarrollarse completamente (Rankinen y cols. 2006; Moleres y cols. 2013).

En 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que alrededor del 39% de los adultos de 18 o más (un 38% de los hombres y un 40% de las mujeres) tenían sobrepeso mientras que el 13% de la población adulta mundial eran obesos: en cifras esto significa que más de 1900 millones de adultos de 18 o más tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. Estos datos de prevalencia subrayan que estas condiciones constituyen serios problemas globales, siendo además altamente perjudiciales para el estado de salud del individuo. En 2011, la OMS subrayó que el sobrepeso y la obesidad eran el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo y que cada año fallecían al menos 2,8 millones de personas adultas como consecuencia de las mismas. Asimismo, se estimó que el 44 % de los casos de diabetes, el 23 % de los casos de cardiopatías isquémicas y entre el 7 y el 41 % de algunos cánceres eran atribuibles al sobrepeso y la obesidad.

Estos efectos deletéreos de la obesidad se pueden atribuir a dos factores: uno es el incremento de tejido adiposo en sí mismo y el otro es el aumento en la secreción de adipoquinas por las células adiposas engrandecidas (Bray 2003). Los adipocitos secretan una variedad de moléculas metabólicamente e inmunológicamente activas, como los ácidos grasos, el colesterol, las citoquinas pro-inflamatorias y las adipoquinas, entre las que se encuentran la leptina, la adiponectina y la resistina. Estos mediadores tienen importantes efectos endocrinos sobre regulación del apetito y el consumo de alimentos, así como en los patrones de almacenamiento y movilización de las reservas energéticas en el cuerpo. Existen numerosas evidencias en la literatura que demuestran como sus variaciones a nivel plasmático (resumidas en la Tabla 1) pueden influenciar la fisiopatología de otras enfermedades inflamatorias crónicas (Flier 2004; Wang y cols. 2007).



| Aumentados                               | Disminuidos  |
|--|--------------|
| Leptina                                  | GH           |
| TSH                                      | Grelina      |
| Insulina                                 | Adiponectina |
| IGF-1                                    |              |
| Androgénos                               |              |
| Progesterona                             |              |
| Citoquinas (TNF- $\alpha$ ; IL-6; MCP-1) |              |
| ACTH/cortisol                            |              |
| Sistema nervioso simpático               |              |

Tabla 1. Cambios endócrinos asociados con la obesidad. TSH: tiotropina; IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral; IL-6: interleucina-6; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1; ACTH: hormona adrenocorticotropa; GH: hormona del crecimiento. Tabla adaptada por Pinkney y Kepelman (2004).

Entre todas las relaciones que la evidencia científica actual apoya, la asociación positiva de la obesidad y la periodontitis está ganando un interés creciente en los últimos años. Diversas revisiones sistemáticas de estudios, tanto clínicos como epidemiológicos, han destacado un incremento en parámetros clínicos periodontales como el sangrado al sondaje, la profundidad de la bolsa periodontal o la pérdida de hueso alveolar, en aquellos sujetos que padecen sobrepeso u obesidad (Keller y cols. 2015; Suvan y cols. 2015; Nascimento y cols. 2015). Por ejemplo, en un estudio longitudinal reciente, que contaba con 1038 varones caucásicos estadounidenses, se destacó que la obesidad proporcionaba un riesgo de progresión de la periodontitis entre el 41 y el 72%, después del ajuste para varias covariables (Gorman y cols. 2012); mientras que en un ensayo japonés con un tamaño muestral de 3590 individuos se logró establecer una relación dosis-respuesta entre el sobrepeso/obesidad y el riesgo de periodontitis (Morita y cols. 2011).

Una de las teorías sobre la plausibilidad biológica de la posible relación entre la obesidad y la periodontitis sugiere la implicación del estado hiper-inflamatorio, del metabolismo de los lípidos

alterado, así como la resistencia a la insulina propios de la obesidad (Nishimura y Murayama 2001). Este estado dismetabólico producido por la secreción aberrante de los adipocitos puede llevar a un aumentado desajuste de los tejidos periodontales ya afectados por la invasión bacteriana. La elevación sistémica de los marcadores biológicos de la inflamación, como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), de los mediadores del estrés oxidativo (Boesing y cols. 2009; Bullon y cols. 2014) y de las adipoquinas pro-inflamatorias podría modular la cantidad de producción de metaloproteínas y la actividad de los osteoclastos, influyendo en la cantidad de destrucción conectiva y ósea alrededor de los dientes (Graves 2008).

Otros estudios también sugieren la posibilidad de que el aumento de tejido adiposo propio de la obesidad produzca una desregulación del sistema inmune, haciendo a estos individuos más susceptibles de padecer otras enfermedades infecciosas como la periodontitis (do Nascimento y cols. 2013; Zhu y Nikolajczyk 2014).

Sin embargo, las conclusiones de las más recientes revisiones sistemáticas evidencian que los factores de confusión constituyen el mayor problema en la interpretación de las asociaciones encontradas entre el sobrepeso/obesidad y la periodontitis, y subrayan que se necesitan ulteriores estudios prospectivos para investigar las relaciones reales de causalidad entre estas dos condiciones y para comprender los verdaderos mecanismos moleculares involucrados (Nascimento y cols. 2015; Winning y Linden 2017).

El problema que tienen los ensayos en humanos sobre patologías relacionadas al estilo de vida como la obesidad y la periodontitis, es que siempre se exponen a un elevado riesgo de sesgo debido al control de los factores de confusión residuales, como tabaquismo, estado de higiene dental u otras patologías que interfieran, aunque se utilicen nuevas y potentes estrategias

estadísticas como la aleatorización mendeliana o los análisis bayesianos (Franks y Atabaki-Pasdar 2017).

Bajo este punto de vista, los modelos animales siguen siendo una herramienta imprescindible en la investigación periodontal porque permiten un análisis más preciso de las relaciones de causa-efecto y un mejor control de los parámetros de estudio con respecto a los estudios en humanos (Graves y cols. 2012). La fortaleza de un determinado modelo animal reside en su capacidad de averiguar una hipótesis específica, más que a su fidelidad a los diferentes aspectos relacionados con la patogénesis de una enfermedad. La investigación preclínica “in vivo” todavía se considera indispensable para explorar los detalles moleculares más finos que apoyen las asociaciones epidemiológicas entre la periodontitis y otras enfermedades sistémicas (Hajishengallis y cols. 2015).

Entre todos los modelos animales disponibles para el estudio de la periodontitis, las ratas Wistar constituyen una solución valiosa y eficiente, debido a que estos animales son muy manejables en laboratorio, son baratos y tienen una estructura de los molares similares a los humanos (Klausen 1991). Además, en el modelo murino se logra reproducir fiablemente la periodontitis, a través de ligaduras o de enjuagues (Graves y cols. 2012), y se puede abordar la inducción de la obesidad, que no sería aprobada por el comité de ética para otros animales, como por ejemplo los perros.

Aun así, los experimentos llevados a cabo hasta ahora en ratas obesas a las que se indujo periodontitis, no demostraron incrementos de pérdida ósea significativos comparados con los controles sin periodontitis y, según nuestro conocimiento, ninguno de los estudios previos analizó los cambios en los niveles plasmáticos de los biomarcadores relacionados con la obesidad (Simch y cols. 2008; Verzelletti y cols. 2012).

## **Justificación e hipótesis**

La relación entre obesidad y periodontitis ha sido demostrada en múltiples estudios (Linden y cols. 2013) pero el mecanismo intrínseco que los relaciona todavía no está claro (Akram y cols. 2016). Se supone que el desequilibrio en los factores hormonales, microbiológicos e inmunológicos causado por las dos patologías puede jugar un papel relevante en modular sus respectivas fisiopatologías (Martí y cols. 2001; Faraj y cols. 2004; Haffaje y Socransky 2009). Existen muchas controversias al considerar estas asociaciones verdaderamente causales y bidireccionales, o atribuirles a factores etiológicos comunes en ambas las patologías (Winning y Linden 2017). Con el fin de abordar el asunto, hemos llevado a cabo este trabajo con las hipótesis de que una dieta alta en grasa puede influir sobre la severidad de la periodontitis y que la periodontitis puede empeorar el control de los parámetros sistémicos de la obesidad.

## **Objetivos**

**Primario:** Analizar el desarrollo de periodontitis en relación a un consumo de dieta alta en grasa.

### **Secundarios:**

1. Estudiar el desarrollo de periodontitis en ratas adultas macho en función de su masa corporal.
2. Estudiar la posible interacción entre periodontitis y obesidad que pueda potenciar los efectos deletéreos locales y sistémicos de estas enfermedades.

## **Materiales y métodos**

### **Animales y diseño experimental**

Se trata de un estudio prospectivo, aleatorizado y controlado en modelos animales. Para esta investigación experimental "*in vivo*" se utilizaron 28 ratas Wistar macho con un peso inicial de 180g (Harlam Laboratories; Barcelona, España).

El número mínimo de animales necesarios para el experimento fue calculado teniendo en cuenta la frecuencia de aparición de periodontitis de forma espontánea en animales con dieta estándar (16%) y su frecuencia en animales alimentados con dieta hipergrasa (55%) (Cavagni y cols. 2013). Se realizó el cálculo del tamaño muestral para la diferencia en estas proporciones eligiendo una potencia mínima del 50% y un valor P de 0,10, asegurando así el número mínimo de animales por grupo que permita diferenciar entre la aparición espontánea o provocada de la enfermedad.

Los animales se mantuvieron en condiciones estándares de luz (12:12- horas de ciclos luz/oscuridad; luz a partir de las 08:00) y temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (España). El diseño experimental y los cuidados de los animales recibieron la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Universidad Complutense de Madrid, así como de la Comunidad de Madrid. Esta investigación se llevó a cabo de acuerdo a las pautas del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Drogas, del Instituto Nacional de Salud y a las Guías para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Todos los procedimientos que implicaron algún tipo de dolor se realizaron bajo anestesia utilizando una mezcla de ketamina (0,08 mg/100 g) y Xilacina (0,04 mg/100 g) en concentraciones apropiadas (Brandelero y cols. 2013).

Los animales fueron divididos en dos grupos en función de la dieta que se les administraba, control o dieta alta en grasa para inducir obesidad. Tras 11 semanas cada uno de los grupos se

subdividió en otros dos grupos en función de si se les indujo o no periodontitis dando lugar a los 4 grupos (n=7) de estudio (Fig. 1).

1. Ratas con dieta control (CON)
2. Ratas con dieta alta en grasas (HFD)
3. Ratas con dieta control y periodontitis inducida (CON-Perio)
4. Ratas con dieta alta en grasas y periodontitis inducida (HFD-Perio)

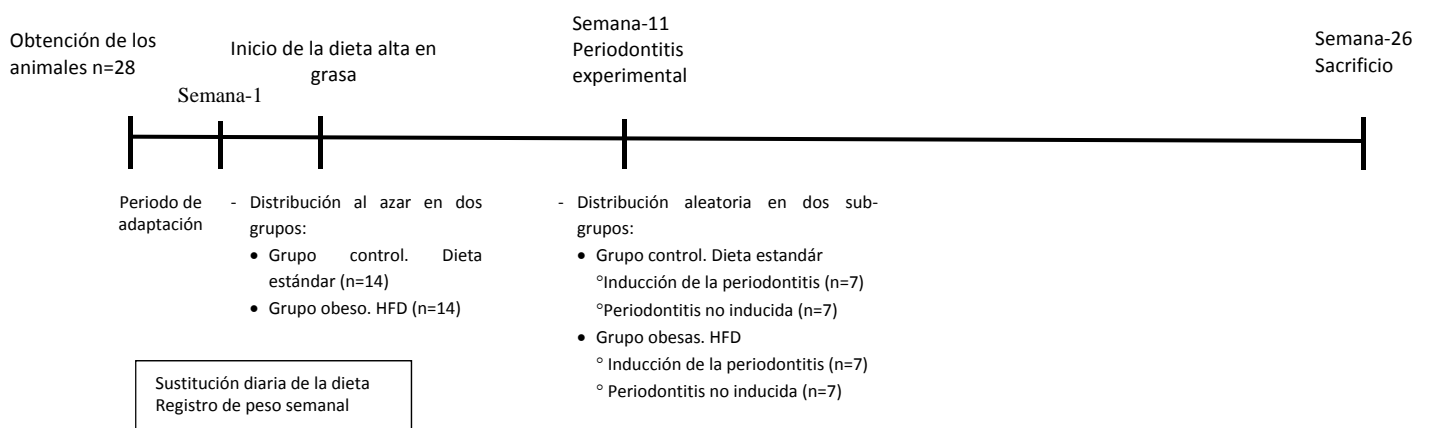


Figura. 1. Línea del tiempo con la que se ha desarrollado el experimento.

### Metodología para inducir la obesidad

Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: uno de ellos recibió una dieta alta en grasas (TD 03307, Harlam Iberica, Barcelona, España) y el otro grupo se alimentó con una dieta control o estándar (Harlam Iberica, Barcelona, España) ambos *ad libitum*. Tan pronto como la masa corporal de las ratas alimentadas con la dieta grasa alcanzó valores del 16% por encima de la de los controles (después de 66 días de experimento), cada grupo se subdividió en dos subgrupos, con y sin inducción de la periodontitis. Las dietas fueron administradas a lo largo de todo el experimento. En la Tabla 2 se muestra las características de las dietas administradas a los diferentes grupos de estudio.

|                                     | Dieta Control | Dieta alta en grasa |
|-------------------------------------|---------------|---------------------|
| % Grasas                            | 3,00          | 35,20               |
| % Carbohidratos                     | 60,00         | 35,50               |
| % Proteínas                         | 16,00         | 20,40               |
| % Vitaminas y minerales             | 21,00         | 8,90                |
| Contenido calórico (Kcal/g)         | 2,90          | 5,40                |
| Grasas consumidas (Kcal/día)        | 1,66          | 28,00               |
| Carbohidratos consumidos (Kcal/día) | 33,23         | 28,42               |
| Proteínas consumidas (Kcal/día)     | 11,63         | 16,33               |

Tabla 2. Porcentajes relativos de nutrientes presentes en cada una de las dietas, por cada 100 gramos de comida, administradas a los dos grupos de ratas.

### Metodología para inducir la periodontitis

Una vez que se diagnosticó la obesidad, cada grupo de animales se subdividió en dos grupos (n=7) (Fig.1) con y sin la inducción de la periodontitis. Para inducir la periodontitis en las ratas, se utilizó una solución de dos patógenos periodontales, *P. gingivalis* cepa ATCC W83K1 y *Fusobacterium nucleatum* cepa DMSZ 20482. Estas bacterias se cultivaron en un caldo de cultivo Brain Heart Infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.) en jarras de anaerobiosis con 80% de N<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El crecimiento de cada una de las bacterias se ajustó por espectrofotometría (550 nm) con el objetivo de obtener una solución de BHI con 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (UFC/ml) para cada una de las bacterias. Estos cultivos puros se mezclaron y centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm para separar las bacterias del medio de cultivo. Una vez que se eliminó el sobrenadante, las bacterias resultantes se resuspendieron con una solución de PBS (*Phosphate buffer solution*, solución tampón fosfato) con carboximetilcelulosa (CMC) al 2% (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y se mezcló utilizando un vortex a una velocidad media de 200 a 300 rpm aproximadamente usando una modalidad continua durante 1/2 minutos. Se utilizó un mililitro de la suspensión bacteriana (infección polimicrobiana) para inducir la periodontitis a través de enjuagues orales (Polak y cols. 2009). El enjuague oral se administró por

una jeringa estéril sin anestesia, cuatro días consecutivos a la semana, durante 12 semanas, en base a los resultados obtenidos en el estudio piloto previo (CEA-UCM 51/2013).

La fase de crecimiento del cultivo bacteriano, el medio de suspensión, la dosis y los procedimientos de infección fueron todos estandarizados, y los mismos protocolos de preparación e infección se utilizaron a lo largo de todo el experimento.

### **Metodología para la eutanasia**

Las ratas se sacrificaron, en ausencia de anestesia, mediante decapitación bajo condiciones de mínimas estrés, empezando a las 09:00h.

### **Test de tolerancia a la glucosa**

Se determinaron los niveles de glucosa en sangre tras 14 horas de ayuno, en los cuatro grupos de animales al final del experimento. Para realizar el test se les administró la glucosa por vía intraperitoneal (2 g de glucosa / Kg de peso de la rata) y se obtuvieron muestras de sangre desde la vena lateral de la cola a 0, 15, 30, 60 y 120 minutos utilizando un glucómetro (Spectronic Accu-chek sensor ROCHE, EE.UU.) (Watanabe y cols. 2008).

### **Análisis de las muestras de sangre**

Después de la eutanasia, se recogió la sangre troncular en tubos de poliestireno con EDTA (BD vacutainer K2E (EDTA) ref: 367525). La sangre se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min para obtener el plasma. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

Se midieron las concentraciones plasmáticas de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, adiponectina y leptina utilizando la técnica de inmuno-ensayo, a través del Sistema Luminex-200 y la plataforma XY (Luminex® Corporation, Oosterhout, Holanda). Todos los materiales necesarios se obtuvieron de Luminex® Corporation para la calibración adecuada de la técnica. Los resultados obtenidos se



analizaron con el software xPonent® (Luminex® Corporation, Oosterhout, Holanda) y se expresaron como picogramos por mililitro.

Las concentraciones plasmáticas de visfatina y resistina se midieron utilizando un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) específico para ratas (Qayee Bio Technology, Shanghai, China). Los resultados se expresaron en nanogramos por mililitro. Los ácidos grasos libres (FFA), los triglicéridos, la lipoproteína de alta densidad (HDL), la lipoproteína de baja densidad (LDL) y el colesterol total (TC) se determinaron utilizando kits colorimétricos comerciales (BioVision Incorporated, Milpitas, EE.UU.). Todas estas determinaciones analíticas se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Examen periodontal**

*Índice Gingival (IGM).* Se utilizó el IGM en acuerdo a Lobene y cols. (1986), para evaluar la inflamación gingival, empleando los siguientes criterios:

- 0 = ausencia de inflamación.
- 1 = inflamación leve o pequeños cambios en el color o en la textura, pero no en todas las porciones del margen gingival o de la papila.
- 2 = inflamación leve en todas las porciones del margen gingival o de la papila.
- 3 = inflamación moderada, eritema, edema y/o hipertrofia del margen gingival o de la papila.
- 4 = inflamación severa: eritema, edema, hipertrofia del margen gingival, sangrado espontaneo, congestión papilar o ulceración.

*Profundidad de bolsa (PPD).* Se empleó una sonda con una punta redonda de 0,4 mm de diámetro (Hu-Friedy Mfg. o, LLC, Chicago, EE.UU.). La PPD se registró desde el margen gingival hasta el fondo del surco o de la bolsa. Los valores medios de PPD (en mm) considerados normales en las

ratas son alrededor de 0,3 mm (Liu y cols. 2012), mientras que las lesiones periodontales se han definido por PPD entre los 0,5 mm y 1 mm (Björnsson y cols. 2003; Simch y cols. 2008).

*Sangrado al sondaje* (BOP). Después 10 segundos de sondaje periodontal, se atribuyó el valor “0” a los sitios que no presentaban sangrado, y el valor “1” a los que sí lo presentaban (Lang y cols. 1986).

### **Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como medias (error estándar de la media, E.M.S) e intervalos de confianza (95% CI). En todos los parámetros evaluados, la normalidad se estudió con el test de Shapiro-Wilk y luego se seleccionó un test estadístico apropiado. Se emplearon ANOVA o T-tests independientes para determinar las diferencias entre los grupos. Todos los análisis se llevaron a cabo en BM SPSS Statistics 22.0; IBM Corporation, Armonk, NY, EE.UU. Se utilizó el animal como unidad de análisis y el nivel alfa se estableció en 0,05.

## Resultados

### Inducción de la obesidad

El peso de los animales al inicio era de aproximadamente 180 g. Independientemente de los grupos, la ingesta diaria de alimentos medida a lo largo del experimento fue similar (16,3 (0,26) g (HFD) y 18,1 (0,83) g (controles);  $p = 0,72$ ).

Los animales expuestos a una dieta hiperlipídica e hipercalórica presentaron un incremento de peso significativo ( $p < 0,05$ ) comparado con los controles a partir de las 4 semanas.

Esta diferencia en el incremento de peso entre los grupos se mantuvo hasta el final del experimento, y los resultados están resumidos en la Figura 2.

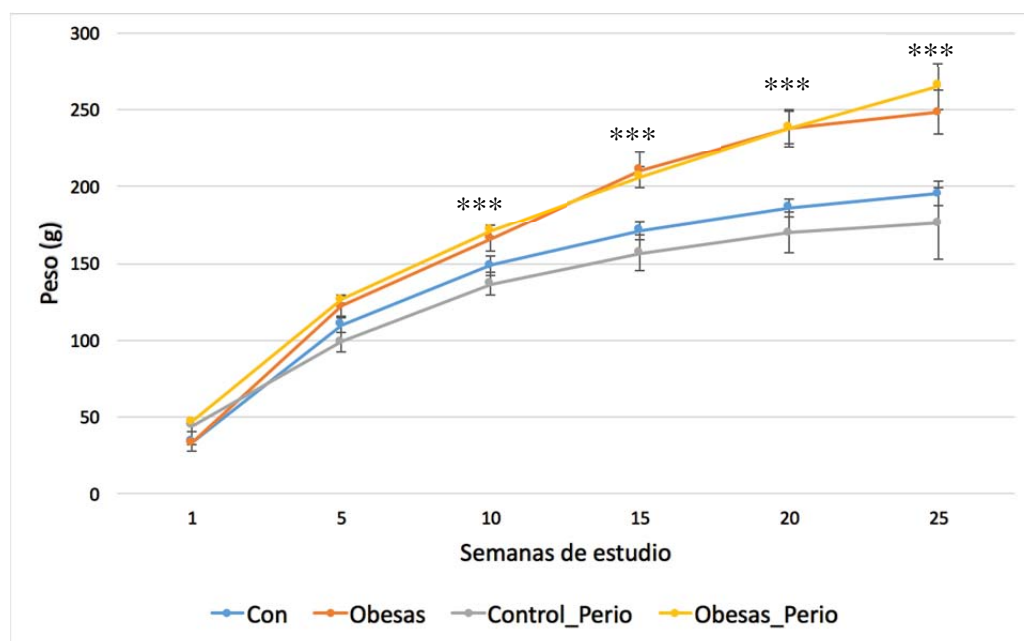


Figura 2. Diferencias entre los incrementos de peso entre los 4 grupos de estudio a lo largo del experimento. Los datos se muestran como media (E.M.S) (\*\*\*)  $p < 0,001$

## Inducción de la periodontitis

Los resultados de las mediciones periodontales se presentan en la Tabla 4. Al inicio, todas las ratas presentaban profundidades de bolsas asociadas con salud periodontal ( $< 0,3$  mm). En el grupo HFD se produjo un incremento significativo en la PPD entre el inicio y las 11 semanas. Además, aparecen diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre el grupo control (Con) y el grupo alimentado con dieta alta en grasa (HFD). De la misma manera, los grupos con periodontitis inducida mostraron un incremento de PPD estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a los grupos sin periodontitis. Las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y con la periodontitis inducida (HFD-Perio) desarrollaron bolsas periodontales significativamente más profundas que el grupo HFD .

Del mismo modo, ninguna de las ratas presentó sangrado al sondaje al inicio del estudio. Después de todo el experimento, el grupo CON siguió sin mostrar ningún signo de sangrado, pero este fenómeno apareció en el resto de los grupos. Respecto a MGI, al final del experimento, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre los cuatro grupos.

|                  | PPD (mm/diente)(E.M.S) |                             |                           |                           |
|------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Grupos</b>    | 1                      |                             |                           |                           |
| <b>Basal</b>     | 0,22 (0,007)           |                             |                           |                           |
| <b>Grupos</b>    | 1                      |                             | 2                         |                           |
| <b>Semana 11</b> | 0,22 (0,007)           |                             | 0,44 (0,044)***           |                           |
| <b>Grupos</b>    | 1                      | 2                           | 3                         | 4                         |
| <b>Semana 23</b> | 0,32 (0,04)            | 0,88 (0,04)*** <sup>a</sup> | 0,63 (0,10) <sup>*b</sup> | 1,00 (0,02) <sup>*b</sup> |

|                  | MGI (mm/diente)(E.M.S) |                            |                           |                           |
|------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Grupos</b>    | 1                      |                            |                           |                           |
| <b>Basal</b>     | 0                      |                            |                           |                           |
| <b>Grupos</b>    | 1                      |                            | 2                         |                           |
| <b>Semana 11</b> | 1 (0,63)               |                            | 1,85 (0,22)               |                           |
| <b>Grupos</b>    | 1                      | 2                          | 3                         | 4                         |
| <b>Semana 23</b> | 1 (0,63)               | 2,67 (0,33)** <sup>a</sup> | 1,71 (0,18) <sup>*b</sup> | 3,14 (0,34) <sup>*b</sup> |

|                  | BOP (%rata/grupo)(E.M.S) |                     |       |      |
|------------------|--------------------------|---------------------|-------|------|
| <b>Grupos</b>    | 1                        |                     |       |      |
| <b>Basal</b>     | 0%                       |                     |       |      |
| <b>Grupos</b>    | 1                        |                     | 2     |      |
| <b>Semana 11</b> | 0%                       |                     | 61,6% |      |
| <b>Grupos</b>    | 1                        | 2                   | 3     | 4    |
| <b>Semana 23</b> | 0%                       | 66,6%* <sup>a</sup> | 16,6% | 100% |

Tabla 4. Efectos de una dieta alta en grasa y de la inducción de la periodontitis en los tejidos periodontales. Los datos de los diferentes parámetros se expresan en tres diferentes momentos del experimento; al inicio (todos los animales estaban en el mismo grupo (1)), Semana-11 (tras la inducción de la obesidad, los controles alimentados con una dieta estándar (1) y los obesos con una HFD (2)), Semana-23 (al final del experimento tras la inducción de periodontitis, Controles (1), Obesos (2), Controles con periodontitis (3), Obesos con periodontitis (4)). Las unidades por cada parámetro, más el error estándar de la media (E.M.S.), se expresaron en la tabla. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  análisis univariado de la variancia y t-test independientes o ANOVA. La letra <sup>a</sup> representa las diferencias entre los controles y los con HFD, mientras que la letra <sup>b</sup> representa las diferencias entre el grupo con periodontitis inducida y el grupo control).

### Test de tolerancia a la glucosa

Al inicio del experimento no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p > 0,05$ ) con respecto a los niveles de glucosa. Sin embargo, en el minuto 120, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos alimentados con los dos tipos de dietas diferentes. Además, el grupo HFD-Perio exhibió niveles más elevados de glucosa comparado con el grupo HFD. Los resultados están resumidos en la Figura 3.

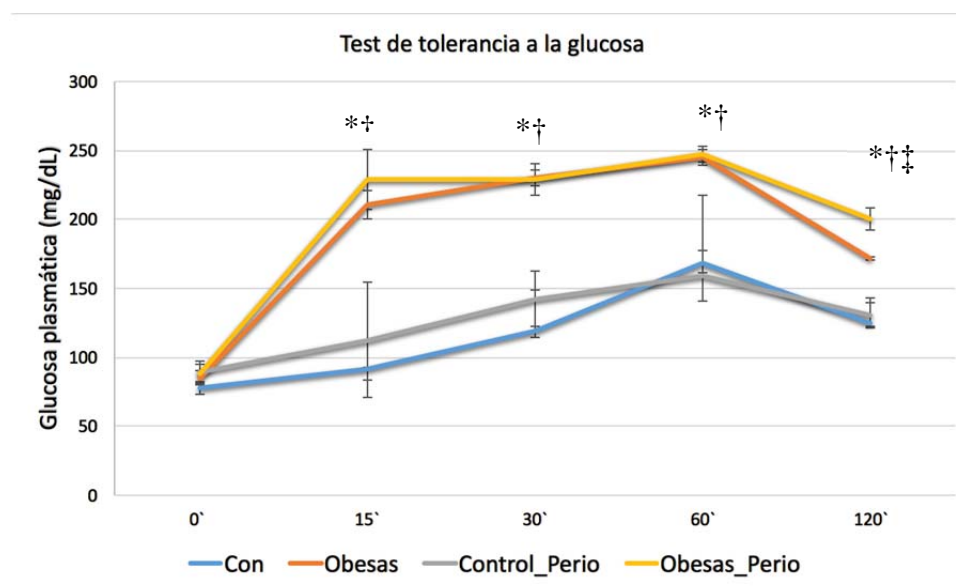
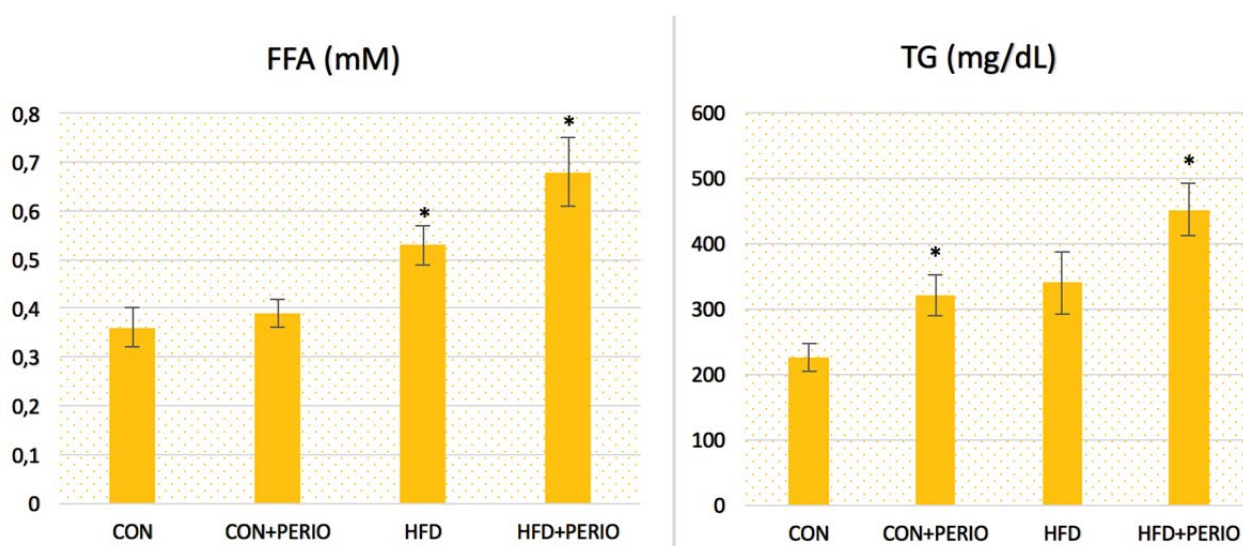


Figura 3. Resultados del test de tolerancia a la glucosa en los cuatro grupos de estudio. Los datos están expresados como la media (SEM) (\*  $P < 0,05$  respecto al grupo control. †  $P < 0,05$  respecto al grupo CON-Perio, ‡  $P < 0,05$  respecto al grupo HFD).

## Estudio bioquímico

El perfil lipídico sanguíneo de las ratas experimentales se muestra en la Figura 4. Los niveles de ácidos grasos libres (FFA) eran significativamente más elevados en el grupo HFD-Perio (0,68, (0,07mM)) respecto a los grupos CON (0,36, (0,04mM)) y CON-Perio (0,39, (0,03 mM)). Un incremento significativo ( $p=0,009$ ) de triglicéridos se observó en los grupos en los que se indujo la periodontitis. Los valores más elevados se observaron en el grupo HFD-Perio. De misma manera, los niveles de colesterol eran significativamente más elevados en el grupo HFD-Perio (118,9 (6,49)) comparados con el grupo CON (94,46 (2,61)), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparar el grupo HFD-Perio y el grupo HFD ( $p>0,05$ ). Los niveles de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) exhibieron una tendencia a disminuir en el grupo HFD-Perio (63,54 (4,15)), respecto al grupo HFD (64,74 (9,09)), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Las gráficas y los resultados numéricos están exhibidos en la Figura 4 y en la Tabla 5.



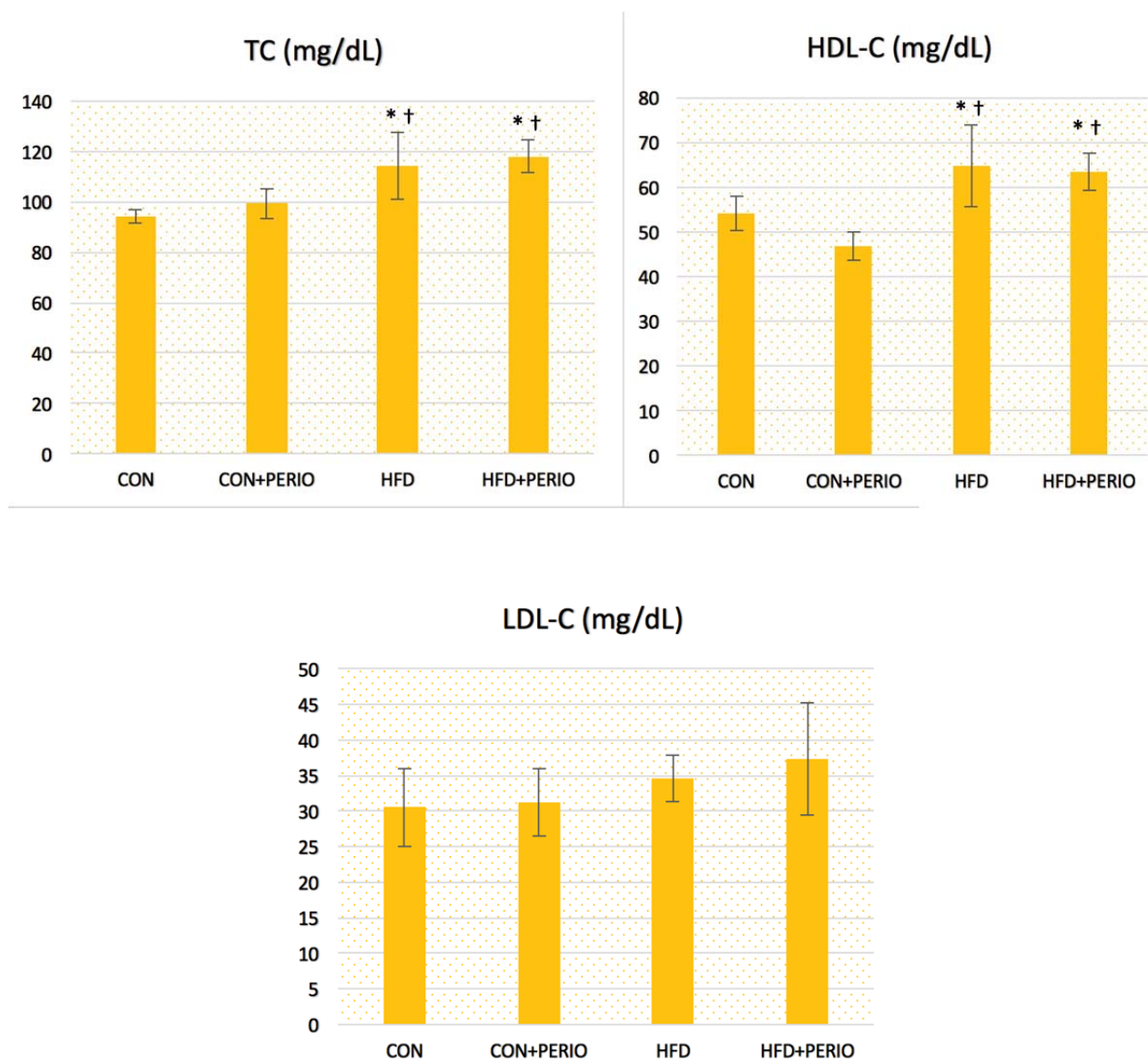


Figura 4. Niveles plasmáticos de lípidos en la sangre. Todos los datos están expresados como medias (E.M.S) (\* $P < 0,05$  con respecto al grupo control. †  $P < 0,05$  con respecto a los controles con periodontitis), análisis univariado de la variancia y t-test independientes o ANOVA y test de Tukey de comparaciones múltiples a posteriori, (HDL-C, colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad; LDL-C, colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad; TC, colesterol total; TG, triglicéridos).

La Figura 5 resume los cambios en los niveles plasmáticos de citoquinas en los grupos experimentales. Las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ ; MCP-1 y TNF- $\alpha$  exhibieron niveles estadísticamente más elevados ( $p < 0,05$ ) en los grupos con periodontitis respecto a los grupos sin periodontitis, excepto para IL-6 que fueron similares en los cuatro grupos. Se observó también una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de IL-1 $\beta$  entre los grupos HFD y HFD-Perio ( $p < 0,01$ ).

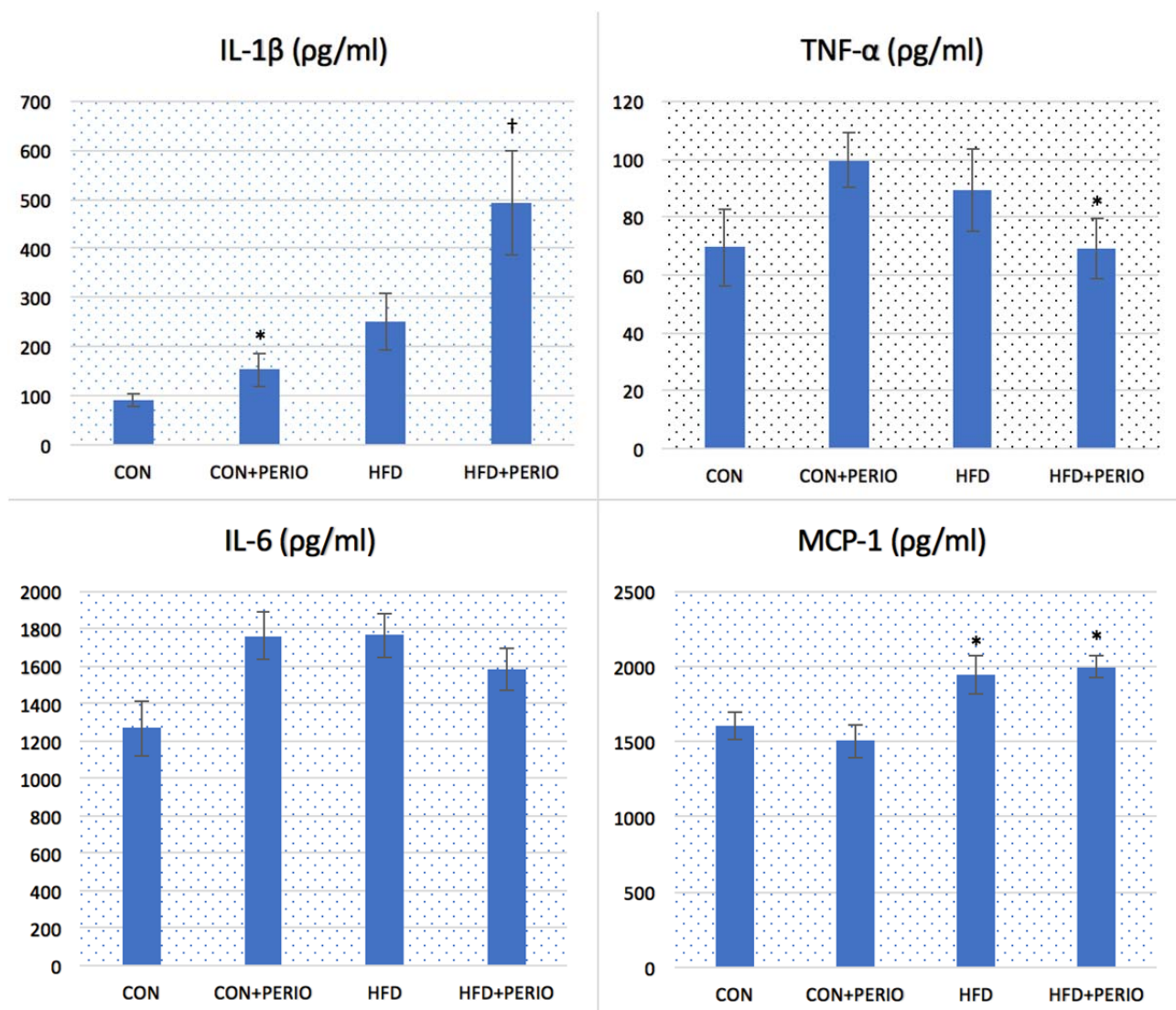


Figura 5. Niveles plasmáticos de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) y proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1) expresados en picogramos por mililitro en los cuatro grupos al final del experimento. Se enseñan las medias más los errores estándares de las medias ( $n = 7$  por cada grupo). (\* $P < 0,05$  con respecto al grupo control. †  $P < 0,05$  con respecto al grupo HFD).



La Figura 6 resume los resultados de los niveles de adipocitoquinas. Las concentraciones plasmáticas de leptina, de visfatina y resistina mostraron tendencia a aumentar en las ratas con periodontitis inducida, principalmente en el grupo HFD-Perio. Por el contrario, los niveles de adiponectina se redujeron en los grupos con periodontitis.

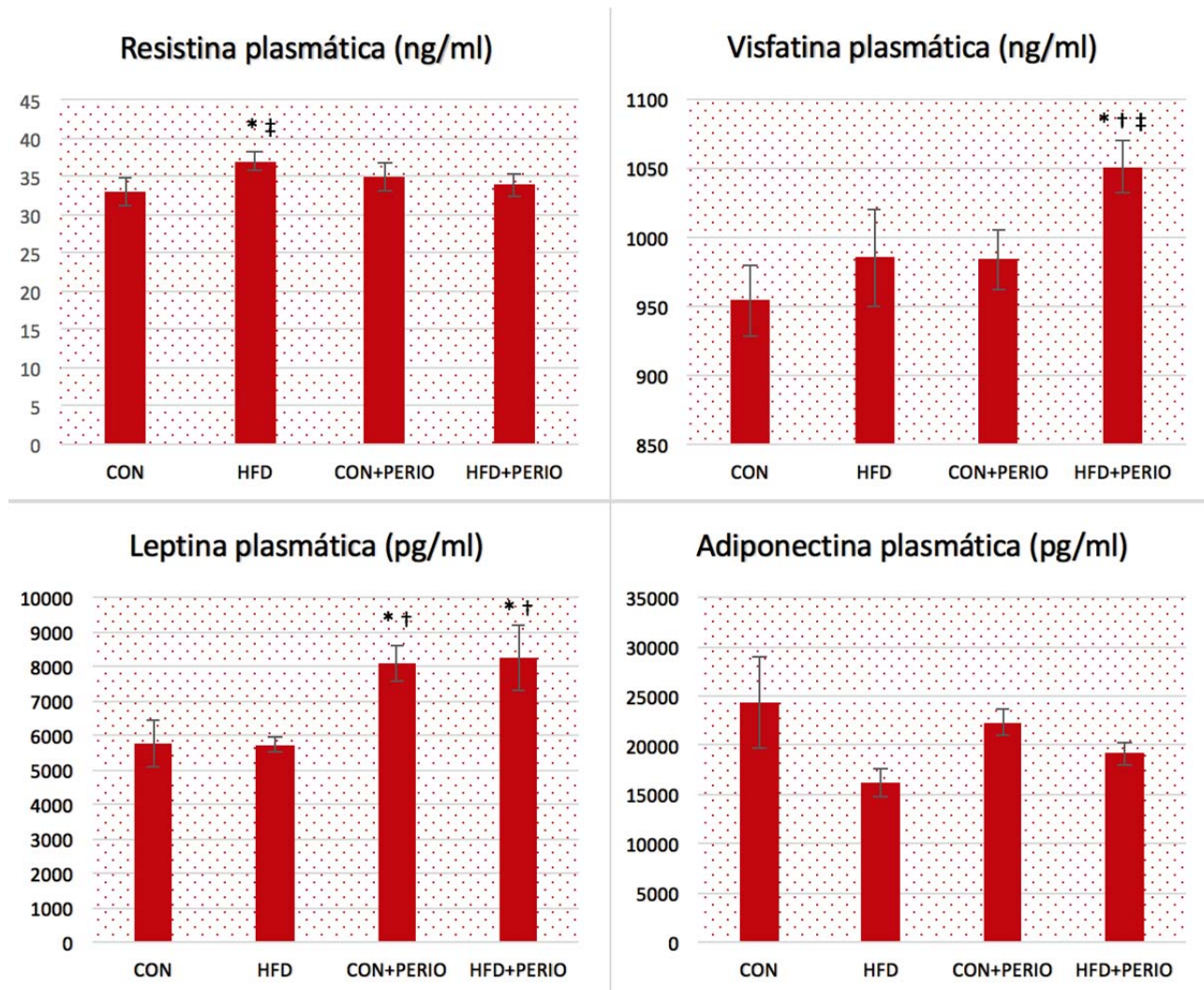


Figura 6. Niveles plasmáticos de adipocitoquinas. Todos los datos están expresados como medias (E.M.S) (\* $P < 0,05$  con respecto al grupo control. †  $P < 0,05$  con respecto a los controles con periodontitis. ‡  $P < 0,05$  con respecto al grupo HFD), análisis univariado de la variancia y t-test independientes o ANOVA y test de Tukey de comparaciones múltiples a posteriori.

## **Discusión**

### **Inducción de la obesidad y de la periodontitis**

El presente estudio en animales se llevó a cabo para investigar si el consumo de dieta alta en grasa tuviese un impacto en los parámetros clínicos e inflamatorios sistémicos de la periodontitis. Los resultados han demostrado que la obesidad inducida por una dieta alta en grasas se correlaciona con una mayor severidad de la periodontitis.

Los datos de peso y los parámetros odontológicos resumidos en las Tablas 3 y 4, confirman que las dos enfermedades se produjeron satisfactoriamente. En los estudios experimentales en ratas, se considera que una diferencia de peso corporal de aproximadamente el 15% entre los grupos puede ser definida como obesidad (Svensson y cols. 1996). Aquí, los animales del grupo test (HFD) presentaban un peso corporal medio del 16% más elevado que los controles (CON) a las 10 semanas, diferencia que es significativa en las ratas y suficiente para ser considerada como obesidad. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (Simch y cols. 2008; Verzelletti y cols. 2012).

Con respecto a los índices periodontales, uno de los datos más relevantes es que, al desarrollar obesidad, las ratas presentaban una media de profundidad de sondaje del doble con respecto a los controles, en la undécima semana. Este hallazgo está de acuerdo con los resultados de un estudio en ratas Wistar llevado a cabo por Cavagni y cols. (2013), en el que se destacó que la obesidad incrementa la incidencia de periodontitis espontánea en los animales.

La definición de umbrales por la presencia o ausencia de periodontitis, a través de un examen clínico en las ratas, es una cuestión esencial, considerando que se utilizó la profundidad de bolsa y no la pérdida ósea para obtener una evaluación en tiempo real de la progresión de la enfermedad.

Analizando los parámetros clínicos de los dos grupos en los que se indujo la periodontitis, los resultados indican que el hecho de padecer obesidad influye en la profundidad del sondaje y en el índice gingival aumentándolos. Estos hallazgos confirman la hipótesis de trabajo y están avalados por datos epidemiológicos y clínicos en humanos que indican una fuerte influencia recíproca entre las dos enfermedades (Chaffee y Weston 2010; Suvan y cols. 2015). Sin embargo, la revisión de los estudios preclínicos previos dio resultados dispares. Por ejemplo, el trabajo de Verzelletti y cols. (2012) encontró niveles más elevados de pérdida ósea en las ratas obesas solo si se consideraban las caras palatinas, mientras que Simch y cols. (2008) no se logró demostrar alguna diferencia. Es posible que la metodología y el tiempo empleados para la inducción de la periodontitis en los diferentes estudios podría explicar las diferencias en los resultados.

### **Inflamación sistémica**

En el presente estudio se evaluaron los efectos separados y combinados que la periodontitis y la obesidad tienen en los perfiles de citoquinas plasmáticas en ratas. Se eligieron IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 al tratarse de citoquinas pro-inflamatorias que proporcionan una conexión evidente entre obesidad e inflamación (Fantuzzi 2005) y juegan un papel importante en la progresión de la periodontitis (Preshaw y Taylor 2011).

En general, los resultados demuestran que los niveles de los mediadores pro-inflamatorios estaban alterados en las ratas que eran obesas y/o padecían periodontitis con respecto a los controles con peso normal y sin periodontitis. Además, la combinación de las dos enfermedades, con respecto a la obesidad solo, se relaciona con niveles más altos de IL-1 $\beta$ . Estos hallazgos indican que la obesidad y la periodontitis pueden, independientemente o juntas, alterar los niveles sistémicos de citoquinas, principalmente a favor de la inflamación. Es posible que el incremento en la inflamación crónica de bajo grado producida por la periodontitis se añada a los efectos

ingentes en los parámetros inflamatorios debidos a la obesidad. En las lesiones periodontales, las células inflamatorias y los fibroblastos producen un exceso de IL-1 $\beta$ . que puede difundir en el torrente sanguíneo. Esta citoquina tiene un efecto adverso sobre el tejido adiposo e induce una severa inflamación en la obesidad (Su y cols. 2013).

Sin embargo, la hipótesis general de que los individuos con obesidad y periodontitis hubieran presentado los niveles más elevados de mediadores inflamatorios fue rechazada. Este asunto está de acuerdo con las conclusiones de un ensayo en humanos donde se midieron los niveles locales y sistémicos de citoquinas y adipocitoquinas (Zimmermann y cols. 2013).

Es interesante destacar la falta de alteración en los niveles de TNF- $\alpha$  en el grupo de los obesos con periodontitis que puede parecer paradójica. De hecho, este dato está en contraste con la mayoría de los resultados de otros estudios, donde se obtuvieron correlaciones muy significativas entre los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  y las dos enfermedades juntas (Endo y cols. 2010). Solo Zimmermann y cols. en 2013 tuvieron valores similares a los nuestros y los atribuyeron a los factores de confusión, como edad, sexo o tabaquismo. La nuestra experimentación se condujo bajo condiciones de laboratorio muy controladas y, por lo tanto, debido a la homogeneidad en los fenotipos de las ratas, se pueden excluir los efectos de todos los citados factores de confusión. En literatura hay dos estudios (Tanabe y Grenier 2008; Biswas y Lopez-Collazo 2009), donde se evidencia que los altos niveles de lipopolisacárido (LPS) liberados por las bacterias Gram negativas, y las altas concentraciones sanguíneas de ácidos grasos de la obesidad, pueden estimular los receptores Toll-like (TLR) en las células involucradas en la respuesta inmune innata y conllevar a una condición definida como homotolerancia. Esta homotolerancia consiste en una regulación hacia abajo en la producción de mediadores inflamatorios y puede representar una medida de defensa del hospedador que se ha evolucionado en el tiempo, dirigida a la protección contra el

choque séptico inducido por endotoxinas y a la prevención de una respuesta inflamatoria sistémica potencialmente letal. Curiosamente, esta homotolerancia no se había observado en todo el espectro de citoquinas proinflamatorias: las células inmunitarias homotolerantes secretan menores cantidades de TNF- $\alpha$ , pero no de IL-1 $\beta$  o de MMP-9. Estos hallazgos podrían representar la llave para explicar el efecto que obesidad y periodontitis juntas han producido en los niveles de TNF- $\alpha$  plasmáticos, que aparecieron elevados en los grupos que presentaban las dos patologías por separado (CON-Perio y HFD).

Parece complicado establecer relaciones de causalidad a través del estudio de citoquinas. Sus niveles locales y sistémicos se han relacionado con la periodontitis cuando aparecen disminuidos (Tanabe y Grenier 2008) y cuando aparecen aumentados (Zimmermann y cols. 2013). De la misma manera, aunque la obesidad es un estado de hiperinflamación caracterizado por un número amplio de leucocitos y por una sobrerregulación de la red de citoquinas, la eficacia del sistema inmunitario parece disminuida frente a la infección de muchos patógenos orales, entre ellos *P. gingivalis* (Aamar y Leeman 2013) (Fig. 7). Esta falta de concordancia en las evidencias parece debida al papel extraordinariamente complejo y ambivalente que el sistema inmunitario juega en muchas enfermedades, considerado su excesiva tolerancia, es decir la incapacidad en reconocer y eliminar los patógenos y su hiperactivación, ambas involucradas en el desarrollo de la destrucción tisular.

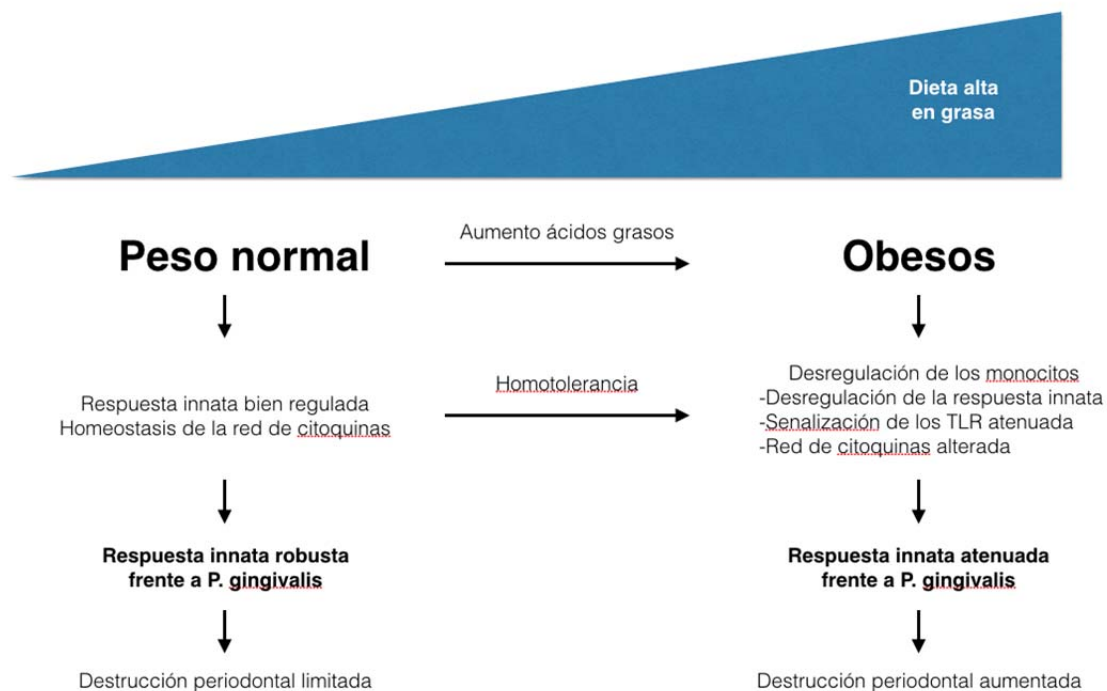


Fig 7. Modelo propuesto para explicar el efecto de la obesidad sobre la respuesta innata frente a *Porphyromonas gingivalis*. Diagrama adaptado por Amar y Leeman 2013.

### Metabolismo de lípidos

La obesidad lleva a una disfunción en el metabolismo de los lípidos (Bray 2004). Todos los parámetros analizados son significativamente elevados en los sujetos obesos con respecto a los controles con peso normal. Estos valores se correlacionaban también con la severidad de la periodontitis y estaban de acuerdo a un reciente estudio transversal que evidenció que los pacientes hiperlipidémicos mostraban valores más altos en los parámetros periodontales con respecto al grupo control (Sayar y cols. 2016).

Las ratas controles con periodontitis (CON-Perio) experimentaron un aumento de triglicéridos con respecto al grupo de los controles sin periodontitis (CON) y una menor cantidad de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C). Además, la combinación de periodontitis y obesidad (HFD-Perio), con respecto a la obesidad solo (HFD), se relacionó con niveles

significativamente más altos de ácidos grasos libres, de triglicéridos y de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad.

Este hallazgo puede ser debido a que las infecciones crónicas locales y las agudas sistémicas inducen cambios profundos en la concentración plasmática de las citoquinas, conllevando a un estado catabólico generalizado caracterizado por un metabolismo alterado de los lípidos, con hipertrigliceridemia y aumentada peroxidación lipídica (Cutler y cols. 1999).

Además, cuando se consideran las relaciones entre la periodontitis, la obesidad y el metabolismo, se tiene que evaluar la presencia de un estado diabético o pre-diabético como factor de confusión. Entre las ratas de este experimento, el grupo HFD-Perio exhibió niveles más elevados de glucosa comparado con el grupo HFD después del test de tolerancia a la glucosa. Las grasas dietéticas han sido consideradas el precursor de la resistencia a la insulina. La conexión metabólica entre las vías glucídicas y las lipídicas son bien conocidas, una menor utilización periférica de la glucosa conlleva a una mayor lipogénesis y a una secreción al torrente circulatorio de nutrientes lipídicos para responder a las demandas metabólicas de los tejidos dependientes de la insulina, como músculo esquelético, hígado, cerebro y tejido adiposo. En un reciente estudio en ratas se ha demostrado que una condición de prediabetes intensifica la inflamación periodontal debido a la aumentada activación de los receptores TLR-2 y TLR-4 (Huang y cols. 2016). También es ampliamente aceptado que existe una relación bidireccional entre la periodontitis y un control alterado de la glucemia (Taylor 2001). Se ha demostrado que el estado inflamatorio sistémico de bajo grado inducido por la periodontitis puede afectar la señalización de la insulina y disminuir la sensibilidad periférica a la misma, por ejemplo, afectando al receptor IRS-1 para la glucosa (Colombo y cols. 2012; Su y cols. 2013).

Estos datos pueden constituir una valiosa justificación biológica para explicar la compleja desregulación de los glúcidos y de los lípidos sanguíneos encontrada, con mayor frecuencia, en los grupos con periodontitis.

### **Adipocitoquinas propias de la obesidad**

El tejido adiposo blanco, especialmente el visceral, secreta una gran variedad de adipocitoquinas propias que conllevan a un estado inflamatorio crónico y a una respuesta inmunitaria alterada (Conde y cols. 2011). Normalmente las adipoquinas que promueven la inflamación, la insulino resistencia, la hipertensión, la trombosis y la aterogénesis, como la leptina y la resistina, son contrabalanceadas por otras anti-inflamatorias como la adiponectina y la visfatina. En la obesidad este equilibrio se ve desbalanceado por el exceso de tejido adiposo visceral y por una resistencia periférica a la leptina (Redinger 2007).

En este estudio, los niveles plasmáticos de resistina se ven incrementados en los grupos con periodontitis (CON-Perio y HFD-Perio), esto sugiriendo que la inflamación periodontal puede modular los niveles sistémicos de este marcador de manera independiente de la obesidad. Este hallazgo puede ser debido a la liberación de resistina por los monocitos y los macrófagos periféricos. De hecho, la resistina, aunque se identificó primariamente en el tejido adiposo, se produce también por las células inmunitarias y se relaciona con la activación de los procesos inflamatorios. Entre otros, se citan un estímulo positivo sobre la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Bokarewa y cols. 2005), y el deterioro de los efectos antiinflamatorios de la adiponectina (Kawanami y cols. 2004). Estos resultados están respaldados por estudios previos en los que el incremento en los niveles plasmáticos de resistina se han asociados a la periodontitis (Saito y cols. 2008) y otros donde se destacó que los niveles de resistina en los pacientes con periodontitis crónica y obesidad no eran significativamente más altos que en los pacientes con solo



periodontitis (Zimmermann y cols. 2013). Debido a estas evidencias, la resistina ha sido también propuesta como potencial biomarcador para definir el riesgo de periodontitis (Akram y cols. 2017).

Solo en las ratas obesas y con periodontitis (HFD-Perio) se identificaron niveles de visfatina significativamente más elevados con respecto a todos los otros grupos. La visfatina es una de las adipocinas más recientemente descubiertas y es capaz de actuar también como factor de crecimiento o citoquina proinflamatoria. Sus niveles plasmáticos se relacionan a la resistencia a la insulina y a la diabetes mellitus de tipo II (Pradeep y cols. 2012). Esto ocurre porque la visfatina se une al receptor de la insulina y causa hipoglicemia reduciendo la secreción de glucosa por el hígado (Adeghate 2008). Se ha demostrado que las concentraciones gingivales y plasmáticas de visfatina aumentan significativamente según la severidad de la periodontitis (Pradeep y cols. 2011).

Las ratas en los grupos controles (CON y CON-Perio) presentaron los niveles plasmáticos más bajos de leptina. Por lo tanto, parece evidente que la obesidad sea la condición que más afecta los niveles circulantes de leptina. La leptina es una proteína secretada por el tejido adiposo que regula negativamente la ingesta de alimentos y aumenta el gasto energético. Además, puede estimular la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias. A pesar de que la leptina reduzca la ingesta de alimentos, los individuos que son obesos tienen niveles más altos de leptina sin la respuesta anoréxica asociada, debido a la resistencia a la misma hormona (Friedmann y Halaas 1998). De hecho, la leptina tiene un papel en los mecanismos de defensa del huésped y sus niveles plasmáticos aumentan en las infecciones y en respuesta a estímulos proinflamatorios, como lipopolisacárido (LPS) y TNF- $\alpha$  (Finck y Johnson 2000). Algunos estudios han demostrado una asociación entre la severidad de la periodontitis y los niveles locales y circulantes de leptina (Karthikeyan y Pradeep 2007), asociación que aquí no se observó de forma pura.

En el presente estudio, se destacan niveles plasmáticos de adiponectina más bajos en ambos grupos con periodontitis (CON-Perio y HFD-Perio). Aquí también, las concentraciones circulantes de este marcador anti-inflamatorio pueden estar influenciadas más por la inflamación periodontal que por la obesidad, como se había observado por la resistina. Estos hallazgos están en línea con las más recientes evidencias que indican una tendencia hacia la disminución de los niveles séricos de adiponectina en los individuos con periodontitis (Saito y cols. 2008). Se ha planteado la hipótesis de que la adiponectina pueda funcionar como regulador negativo de la vía de señalización de los receptores Toll-like y de la formación de osteoclastos en la periodontitis (Yamaguchi y cols. 2010), así que estudios preclínicos han experimentado la administración de este factor para mejorar la condición periodontal de los sujetos obesos y diabéticos (Zhang y cols. 2014).

### **Fortalezas y limitaciones**

Este estudio preclínico “In vivo” se basó en un rígido control de calidad, utilizando todas las posibles herramientas con el fin de evitar los sesgos, como por ejemplo el cálculo del tamaño muestral, la aleatorización, el uso de cuatro grupos comparativos, así como otros aspectos metodológicos relacionados con la cría y el mantenimiento de los animales. Todo esto garantizada una elevada validez interna.

Es importante remarcar que los estudios en animales todavía juegan un papel importante para establecer relaciones de causalidad y que las ratas tipo Wistar representan el modelo más utilizado en la investigación periodontal, debido a las similitudes anatómicas y biológicas con el periodonto humano (Hajishengallis y cols. 2015).

El uso de un modelo murino permitió eliminar los factores de confusión que influyen en los ensayos de causalidad en humanos. El único factor de confusión que se tiene que considerar en

este estudio, y que ya se citó, es la posible influencia que estados prediabéticos asociados al desarrollo de la obesidad, pueden ejercitar sobre los parámetros periodontales y las variables sistémicas de la inflamación. La posibilidad de esta interacción no se puede excluir. De todas formas, se sabe que la diabetes y la obesidad están estrictamente relacionadas y pueden ser abordadas como diferentes aspectos de una misma condición (Cavagni y cols. 2013).

Por fin, se tiene que acordar que en los humanos las características relacionadas a los estilos de vida son fundamentales para desencadenar y sostener ambas las patologías. La obesidad y la periodontitis comparten algunos factores de riesgo, notos o ignotos, que tienen que ser tenidos en cuenta atentamente. Nuestros resultados han proporcionado pruebas de relaciones bidireccionales en un modelo animal. Todavía queda añadir confirmas experimentales a través de otros niveles de evidencia para conseguir aclarar los mecanismos que unen las cadenas patogénicas de estas dos patologías inflamatorias crónicas.

Los nuevos conocimientos tendrían el potencial de ser trasladados en una mejor identificación de algunos objetivos terapéuticos racionales para actuar sobre los procesos claves de la progresión de la periodontitis y de la obesidad. Sus implicaciones son asombrosas, si se consideran las difusiones epidémicas de las dos patologías y sus prevalencias.

## Conclusiones

Este estudio longitudinal ha proporcionado algunas evidencias sobre las relaciones de causalidad que hay entre la obesidad inducida por una dieta alta en grasa y la severidad de la periodontitis experimental en un modelo animal.

El análisis concomitante de los parámetros inflamatorios sistémicos, así como del metabolismo de los lípidos y de las adipocitoquinas propias de la obesidad, ha demostrado importantes asociaciones con los determinantes clínicos. Algunos de estos mediadores podrían tener un potencial como marcadores biológicos para utilizarse en el diagnóstico o como blancos moleculares para futuras intervenciones terapéuticas.

Dentro de las limitaciones de nuestro estudio, se puede concluir que:

- el estado dismetabólico e inflamatorio sistémico producido por el desarrollo de la obesidad es un factor que puede modificar la incidencia y la progresión de la periodontitis;
- el tener periodontitis actúa como factor contribuyente en el exacerbar el estado de inflamación crónica sistémico debido a la obesidad;
- el tener periodontitis puede empeorar el control sobre el metabolismo de los lípidos que ya está desregulado en los sujetos obesos;
- el tener periodontitis, también independientemente de la obesidad, se correlaciona a un desbalance en los niveles sistémicos de adipocitoquinas.

## Referencias

Adeghate E. Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Curr Med Chem*. 2008;15(18):1851–62.

Akram Z, Abduljabbar T, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Cytokine Profile in Chronic Periodontitis Patients with and without Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2016;2016:4801418.

Akram Z, Rahim ZHA, Taiyeb-Ali TB, Shahdan MSA, Baharuddin NA, Vaithilingam RD, et al. Resistin as potential biomarker for chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol*. 2017 Jan;73:311–20.

Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009 Oct;30(10):475–87.

Boesing F, Patiño JSR, da Silva VRG, Moreira E a. M. The interface between obesity and periodontitis with emphasis on oxidative stress and inflammatory response. *Obes Rev*. 2009 May;10(3):290–7.

Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005;174:5789-5795.

Brandelero S, Bonfleur ML, Ribeiro RA, Vanzela EC, Nassar CA, Nassar PO, et al. Decreased TNF- $\alpha$  gene expression in periodontal ligature in MSG-obese rats: a possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? *Arch Oral Biol*. 2012;57(3):300-6

Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2583–9.

Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:85–105.

Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol* 2000. 2014 Feb;64(1):139–53.

Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010 Dec;81(12):1708–24.

Champagne CME, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2003;31:167–80.

Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Coutinho MS de L, Ervolino E, Garbin CAS, et al. Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. *J Periodontol*. 2012 Jul;83(7):864–70.

Conde J, Scotece M, Gómez R, López V, Gómez-Reino JJ, Lago F, et al. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors*. 2011 Dec;37(6):413–20.

Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jul;8(7):481–90.

Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol*. 2010 Apr;81(4):520–6.

- Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol.* 2004 Feb;82(1):170–90.
- Finck BN, Johnson RW. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha induces leptin production through the p55 TNF receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Feb;278(2):R537–43.
- Flier JS. Obesity Wars. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):337–50.
- Franks PW, Atabaki-Pasdar N. Causal inference in obesity research. *J Intern Med.* 2017 Mar 1;281(3):222–32.
- Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol.* 2017 Mar;44 Suppl 18:S94–105.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763-770.
- Gorman A, Kaye EK, Apovian C, Fung TT, Nunn M, Garcia RI. Overweight and obesity predict time to periodontal disease progression in men. *J Clin Periodontol.* 2012 Feb;39(2):107–14.
- Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1585–91.
- Haffajee AD, Socransky SS. Relation of body mass index, periodontitis and *Tannerella forsythia*. *J. Clin Periodontol.* 2009;36:89–99. [\[2\]](#)
- Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014 Jan;35(1):3–11.

Hajishengallis G, Lamont RJ, Graves DT. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*. 2015;6(3):229–35.

Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid and serum leptin: Their relationship to periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 2007;34:467- 472.

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: A new insight into adipocytokine- endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:415-419.

Keller A, Rohde JF, Raymond K, Heitmann BL. Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review. *J Periodontol*. 2015 Jun;86(6):766–76.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):635–43.

Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Jun 28;7(12):738–48.

Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *J Clin Periodontol*. 1986;13(6):590-6.

Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *Int Dent J*. 1973 Sep;23(3):432–7.

Liu R, Li N, Liu N, Zhou X, Dong ZM, Wen XJ, et al. Effects of systemic ornidazole, systemic and local compound ornidazole and pefloxacin mesylate on experimental periodontitis in rats. *Med Sci Monit*. 2012;18(3):BR95-102.

Lobene RR, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L. A modified gingival index for use in clinical trials. *Clin Prev Dent*. 1986;8(1):3-6.



Martí A, Marcos A, Martínez JA. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev.* 2001 May;2(2):131–40.

Moleres A, Martinez JA, Marti A. Genetics of Obesity. *Curr Obes Rep.* 2013 Mar 1;2(1):23–31.

Morita I, Okamoto Y, Yoshii S, Nakagaki H, Mizuno K, Sheiham A, et al. Five-year incidence of periodontal disease is related to body mass index. *J Dent Res.* 2011 Feb;90(2):199–202.

Nascimento GG, Leite FRM, Do LG, Peres KG, Correa MB, Demarco FF, et al. Is weight gain associated with the incidence of periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2015 Jun;42(6):495–505.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:9–11.

Pinkney JH, Kepelman PG. Endocrine determinants of obesity. In: Bray GA, Bouchard C, eds. *Handbook of obesity: etiology and pathophysiology*, 2nd Ed. New York: Marcel Dekker 2004; 655–669.

Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol.* 2009;36(5):406-10.

Pradeep AR, Raghavendra NM, Prasad MVR, Kathariya R, Patel SP, Sharma A. Gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration: their relationship in periodontal health and disease. *J Periodontol.* 2011 Sep;82(9):1314–9.

Pradeep AR, Raghavendra NM, Sharma A, Patel SP, Raju A, Kathariya R, et al. Association of serum and crevicular visfatin levels in periodontal health and disease with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2012 May;83(5):629–34.

Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* 2011;38 (Suppl. 11):60-84.

Proceedings of the 1996 World Workshop in Periodontics. Lansdowne, Virginia, July 13-17, 1996. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):1–947.

Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update. *Obesity*. 2006 Apr 1;14(4):529–644.

Redinger RN. The Pathophysiology of Obesity and Its Clinical Manifestations. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2007 Nov;3(11):856–63.

Saito T, Yamaguchi N, Shimazaki Y, Hayashida H, Yonemoto K, Doi Y, et al. Serum levels of resistin and adiponectin in women with periodontitis: the Hisayama study. *J Dent Res*. 2008 Apr;87(4):319–22.

Sayar F, Fallah S, Akhondi N, Jamshidi S. Association of serum lipid indices and statin consumption with periodontal status. *Oral Dis*. 2016 Nov;22(8):775–80.

Simch RP, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of body weight in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand*. 2008 Jun;66(3):130–4.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134–44.

Svensson AM, Hellerström C, Jansson L. Diet-induced obesity and pancreatic islet blood flow in the rat: a preferential increase in islet blood perfusion persists after withdrawal of the diet and normalization of body weight. *J Endocrinol*. 1996 Dec;151(3):507–11.

Su Y, Wang D, Xuan D, Ni J, Luo S, Xie B, et al. Periodontitis as a novel contributor of adipose tissue inflammation promotes insulin resistance in a rat model. *J Periodontol*. 2013 Nov;84(11):1617–26.

Suvan JE, Petrie A, Nibali L, Darbar U, Rakmanee T, Donos N, et al. Association between overweight/obesity and increased risk of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2015 Jun 9;

Tanabe S-I, Grenier D. Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$  and matrix metalloproteinase 9 secretion. *J Periodont Res*. 2008 Jun;43(3):372–7.

Taylor GW. Bidirectional Interrelationships Between Diabetes and Periodontal Diseases: An Epidemiologic Perspective. *Annals of Periodontology*. 2001 Dec 1;6(1):99–112.

Verzeletti GN, Gaio EJ, Linhares DS, Rösing CK. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *J Appl Oral Sci*. 2012 Apr;20(2):218–21.

Wang Y, Mi J, Shan X–., Wang QJ, Ge K–. Is China facing an obesity epidemic and the consequences? The trends in obesity and chronic disease in China. *Int J Obes*. 2006 May 2;31(1):177–88.

Watanabe K, Petro BJ, Shlimon AE, Unterman TG. Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *J Periodontol*. 2008;79(7):1208–

WHO. World Health Organization – obesity and overweight: fact sheets. 2016.

Winning L, Linden GJ. Periodontitis and Systemic Disease: Association or Causality? *Curr Oral Health Rep.* 2017;4(1):1–7.

Yamaguchi N, Hamachi T, Kamio N, Akifusa S, Masuda K, Nakamura Y, et al. Expression levels of adiponectin receptors and periodontitis. *J Periodont Res.* 2010 Apr;45(2):296–300.

Zhang L, Meng S, Tu Q, Yu L, Tang Y, Dard MM, et al. Adiponectin Ameliorates Experimental Periodontitis in Diet-Induced Obesity Mice. *PLoS One* [Internet]. 2014 May 16

Zhu M, Nikolajczyk BS. Immune cells link obesity-associated type 2 diabetes and periodontitis. *J Dent Res.* 2014 Apr;93(4):346–52.

Zimmermann GS, Bastos MF, Dias Gonçalves TE, Chambrone L, Duarte PM. Local and circulating levels of adipocytokines in obese and normal weight individuals with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2013 May;84(5):624–33.